

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08422

研究課題名(和文)糖鎖変化による肝癌進展機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of hepatocarcinoma progression by glycosylation

研究代表者

大西 秀樹 (Onishi, Hideki)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：30595468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌患者と健常者血清において検出された6種類のIgG結合糖鎖のうち、ガラクトース結合糖鎖が肝癌患者で低下していることが確認された。この原因の検索過程で、リンパ球中のガラクトース転移酵素(B4GALT3)が、肝癌細胞株(Huh7)の培養上清添加によって低下することが判明した。培養上清中の責任物質は血清分画によりmiRが疑われたため、ターゲットをmiRに絞り検討を行った。その結果、Huh7細胞の培養上清中に検出された308個のmiRの中で、B4GALT3に結合するmiR27b-3pがリンパ球中のB4GALT3発現を低下させ、IgG結合糖鎖のガラクトース低下につながっている事が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
糖鎖変化を起こさせる物質を同定するとともに、肝細胞癌病態への関与を明らかとすることは、新たな診断法や治療標的の解明にもつながる。また、免疫グロブリンのガラクトースの変化は癌種を超えた現象であるため、社会的波及効果が極めて高い。

研究成果の概要(英文)：Six types of IgG-binding glycans were identified in the sera of patients with hepatocellular carcinoma and healthy subjects with a combined background. Among them, galactose binding glycans were found to be decreased in patients with hepatocellular carcinoma. While searching for the cause, we confirmed that galactosyltransferase (B4GALT3) in lymphocytes was decreased by adding culture supernatant of a hepatocellular carcinoma cell line (Huh7). Since miR was suspected to be the responsible substance in the culture supernatant by serum fractionation, we narrowed down the target to miR. As a result, 308 miRs were detected in the culture supernatant of Huh7 cells, among which miR27b-3p, which binds to B4GALT3, was found to downregulate B4GALT3 expression in the lymphocytes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アガラクトシル化

1. 研究開始当初の背景

我々は 3000 症例を超える肝細胞癌患者の詳細な臨床情報を、リレーショナルデータベースとして構築し、腫瘍マーカーの意義や予後因子等について解析し報告してきた (Am J Gastroenterol 2006;101:2038-43, Aliment Pharmacol Ther 2010;31:407-14, Br J Cancer 2008;98:1161-5 etc.)。また、これらの研究と基礎研究を結びつけたトランスレーショナルリサーチとして、多分岐鎖糖鎖やガラクトースの欠如した 2 分岐糖鎖が、肝細胞癌患者で多く発現しており、予後因子として有用であることや (Hepatol Res 2015;45:986-93)、血中へモペキシニンに結合している糖鎖のフコシル化も予後に関与していること (Hepatol Res 2012;42:1187-95) 等、血清中の糖鎖発現が肝細胞癌の浸潤・転移等の病態と関与している事を明らかとしてきた。

これらの研究成果を踏まえ、糖鎖と病態との関連の詳細を更に追及することにより、これを臨床へ還元することが可能となると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 肝癌で産生されている、免疫グロブリン糖鎖のガラクトースの低下、及び非癌肝細胞で産生されている糖タンパクの 3 分岐糖鎖を上昇させる物質を同定し、2) これらが癌の進行・転移にどのようにかかわっているかを明らかとする。そして 3) これらの糖鎖変化をもたらす物質をターゲットとした肝癌の診断・予後予測、そして治療の可能性を探索することである。

3. 研究の方法

1) 94 名の肝細胞癌患者 (HCC) と 94 名の健常人ボランティア (HLT) の血清中の IgG 特異的糖鎖の発現を、北海道大学の西村紳一郎教授によって開発された、ハイスループットのグリコプロット法を用いて再確認。

2) ガラクトース発現量を規定する 7 種のガラクトシルトランスフェラーゼのうち、どのサブタイプが B リンパ球において発現し機能しているかを明らかとするため、健常人ボランティアから得られた B リンパ球中の mRNA 発現量を解析し同定。

3) 肝癌細胞株である Huh7 と B リンパ球細胞株との共培養系を用い、B リンパ球中のガラクトシルトランスフェラーゼ mRNA 発現変化を解析し、IgG 結合糖鎖中のガラクトース発現変化に関与するサブタイプを同定。

4) Huh7 より放出されている B 細胞中のガラクトシルトランスフェラーゼ mRNA 発現変化につながる因子のサイズを、Huh7 培養上清をフィルターを用い分画化し、B リンパ球培養上清にそれぞれ添加後、B リンパ球 B4GALT3 の発現変化を見ることで確認。

5) Huh7 が産生するマイクロ RNA を培養上清を用いマイクロ RNA sequencing で同定後、ガラクトシルトランスフェラーゼの発現に関与する可能性のあるマイクロ RNA を、miRDB データベースを用いピックアップ。

6) B リンパ球に選択されたマイクロ RNA を electroporation で導入し、B リンパ球中のガラクトシルトランスフェラーゼタンパク発現の変化を Western blot で確認し裏付けをとる。

4 . 研究成果

・ HCC 患者における IgG 結合糖鎖の変化の確認

HCC と HLT の血清中に 6 種類の IgG 結合型糖鎖 (m/z 1590, 1752, 1793, 1914, 1955, 2057) が検出された。これらの糖鎖のうちガラクトシル化型とアガラクトシル化型の比率は、HCC 患者では HLT に比べて有意に低下していることが確認された ($p \leq 0.001$)。

・ B リンパ球中のガラクトシルトランスフェラーゼの同定

ガラクトシル化にかかわる B4GALT family は B4GALT I-VII の 7 種類より構成されているが、これらのうち B4GALT I と B4GALT III の 2 種が B リンパ球中に主として発現していることが確認された。

・ B リンパ球中のガラクトシルトランスフェラーゼ発現に対する HCC の影響

Huh7 と B リンパ球の共培養の結果、B リンパ球の B4GALT3 が Huh7 から培養液中へ放出される物質によって抑制されることが明らかになった ($p = 0.006$)。B4GALT1 を含め、他の B4GALT の発現変化は認められなかった。

・ B リンパ球中のガラクトシルトランスフェラーゼ発現を変化させる因子の同定

Huh7 が産生し培養上清中に存在している B リンパ球の B4GALT3 発現を抑制する因子の大きさは、フィルタを用いた検討により、200nm~1um であることが判明した。このことより責任因子はサイトカインではなくマイクロ RNA であることが推測された。

・ B リンパ球中のガラクトシルトランスフェラーゼ発現を変化させるマイクロ RNA の同定

まずマイクロ RNA sequencing を行い、Huh7 の上清に放出されるマイクロ RNA を同定した。検出された 308 種類の microRNA のうち、B4GALT3 と HCC に関連するマイクロ RNA を miRDB データベースを用いて検索したところ、43 のマイクロ RNA がヒットした。その中で、マイクロ RNA 27b-3p が B4GALT3 と相補的な配列を持つマイクロ RNA として抽出された。

・ マイクロ RNA 27b-3p の B リンパ球への影響

B リンパ球細胞株である IM-9 をマイクロ RNA 27b-3p を導入後 48 時間培養したところ、IM-9 中の B4GALT3 蛋白発現の低下が確認された ($p = 0.005$)。

・これらの研究により、肝細胞癌がマイクロ RNA 27b-3p を介して B リンパ球中の B4GALT3 を抑制し、IgG 結合糖鎖のガラクトース低下につながるということが初めて証明された。本研究結果については現在論文作成中であり、近日中に詳細が公開される予定である。

・Limitation: IgG 結合糖鎖は、Fc R への結合能を制御する Fc 組成の構造にとって重要な役割を担っていることが知られており、ガラクトース減少ががん免疫低下につながるのではないかと考えられているが、本研究では免疫系への影響については直接的な証明には至らなかった。またコロナ禍での資材調達の遅れも重なり、3 分岐糖鎖変化への言及がかわらず、今後の課題として研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	能祖 一裕 (Nouso Kazuhiro) (10314668)	岡山大学・医学部・客員研究員 (15301)	
研究分担者	白羽 英則 (Shiraha Hideori) (40379748)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関